製品コード RR391A

研究用

TaKaRa

Probe qPCR Mix

説明書

v201509Da

Probe qPCR Mix は、TaqMan®＊1 プローブを用いたリアルタイム PCR（qPCR）検出用の製品です＊2。抗体を利用したホットスタート PCR 酵素とリアルタイム PCR 用バッファーをそれぞれ改良することにより、PCR 阻害物質に対する高い抵抗性、特異性の高い増幅、高い増幅効率、高い検出感度を実現しました。2×濃度のプレミックスタイプ試薬のため、反応液の調製が簡単で、さらに耐熱性 RNase H である Tli RNaseH があらかじめ 2×プレミックス試薬中に添加されており、cDNA を鋳型とした場合、残存 mRNA による PCR 反応阻害を極限まで抑制できます。また、高速 PCR に適しており、幅広いダイナミックレンジで正確なターゲットの定量、検出を再現性よく行うことができ、信頼性の高いリアルタイム PCR 解析が可能です。

本製品の適応機種

- Thermal Cycler Dice® Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980/TP990）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
- Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System および StepOnePlus Real-Time PCR System（Life Technologies）
- LightCycler 96/480 System（Roche Diagnostics 社）
- CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社）
- Smart Cycler System/Smart Cycler II System（Cepheid 社）

＊ 1：The 5′ nuclease process is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd. Purchase of the product does not provide a license to use this patented technology.

＊ 2：SYBR® Green I での検出には、SYBR Green I をプレミックスした SYBR *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820A)、SYBR *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420A)、SYBR Fast qPCR Mix（製品コード RR430A）をご使用ください。

I. 原理

本製品は、耐熱性 DNA ポリメラーゼにより PCR 増幅を行い、PCR 増幅産物を TaqMan プローブによりリアルタイムでモニタリングします。

1. PCR

PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることが出来ます。

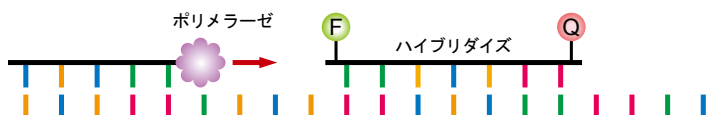
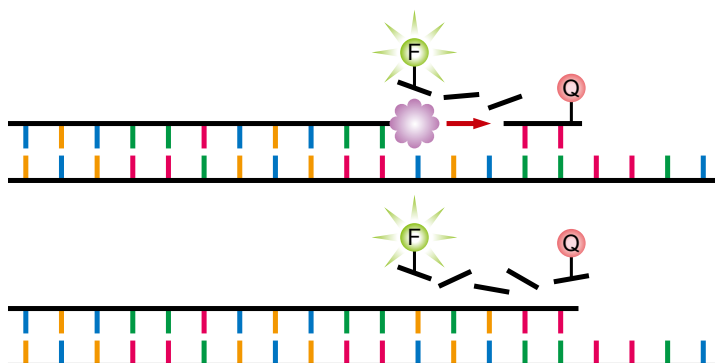
2. 蛍光検出

TaqMan プローブ法

5′ 側を蛍光物質（FAM など）で、3′ 側をクエンチャー物質（TAMRA など）で修飾したオリゴヌクレオチドを反応系に加えます。

アニール条件下では、TaqMan プローブはテンプレート DNA に特異的にハイブリダイズしますが、蛍光はクエンチャーによって抑制されています。伸長反応時、耐熱性 DNA ポリメラーゼの持つ 5′ → 3′ exonuclease 活性により、テンプレートにハイブリダイズした TaqMan プローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されることで発する蛍光を検出する方法です。

1）熱変性

2）プライマーのアニーリング／プローブのハイブリダイゼーション

II. 内容（200 反応分）

Probe qPCR Mix（2×conc.）＊1	1 ml ×5
ROX Reference Dye（50×conc.）＊2	200 μl
ROX Reference Dye II（50×conc.）＊2	200 μl

＊1：PCR 酵素、dNTP Mixture、Mg^{2+}、Tli RNase H を含む。

＊2：Life Technologies のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye（50×）を添加する機種（最終濃度 1×でご使用ください。）
- 7300 Real-Time PCR System
- StepOnePlus Real-Time PCR System　（以上 Life Technologies）

◆ ROX Reference Dye II（50×）を添加する機種（最終濃度 0.5×でご使用ください。）
- 7500 Real-Time PCR System
- 7500 Fast Real-Time PCR System　（以上 Life Technologies）

◆添加の必要がない機種
- Thermal Cycler Dice Real Time System シリーズ（製品コード TP950/TP970/TP980/TP990、TP900/TP960、TP700/TP760）
- LightCycler 96/480 System（Roche Diagnostics 社）
- CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社）
- Smart Cycler System/Smart Cycler II System（Cepheid 社）

<u>本製品以外に必要な試薬、機器（主なもの）</u>

1. リアルタイム PCR 装置（authorized instruments）
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー
4. 検出用 TaqMan プローブ（licensed probe）
5. 滅菌蒸留水
6. マイクロピペットおよびチップ（オートクレーブ処理したもの）

III. 保存

4℃保存：6 ヵ月安定

コンタミネーションには十分注意してください。

本製品は－ 20℃輸送でお届けします。
長期保存の場合は、－ 20℃で保存してください。いったん使用を開始したチューブは 4℃保存し、6 ヵ月を目途にご使用ください。

IV. 特長

1. リアルタイム PCR により、遺伝子の検出、定量を迅速かつ正確に行うことが可能です。

2. 2 倍濃度のプレミックス試薬のためピペッティング操作が簡便です。

3. PCR 阻害物質に高い抵抗性示すため、前処理方法の簡便化など使用用途が広がります。

4. 2×プレミックス試薬中に、耐熱性 RNase H である Tli RNaseH をあらかじめ添加しています。cDNA を鋳型とした場合の、残存 mRNA による PCR 反応阻害を極限まで抑制します。

V. 操作上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 使用時には、泡立てないよう穏やかに転倒混合し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混合されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。

   なお、Probe qPCR Mix (2×conc.) を－ 20℃で凍結保存した場合、保存中に沈殿を生じることがあります。軽く手で暖めるか室温にしばらく置いた後、転倒混合することで完全に溶解します。必ず均一に混合してからご使用ください。

2. 融解した試薬はただちに氷上に置いてください。

3. 本製品は TaqMan プローブを含んでいません。別途、準備してください。

4. 反応液の調製、分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

VI. 操作

【 Thermal Cycler Dice Real Time System III、*II* および *Lite* を用いる場合の操作方法 】

※ Thermal Cycler Dice Real Time System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜1 反応あたり＞

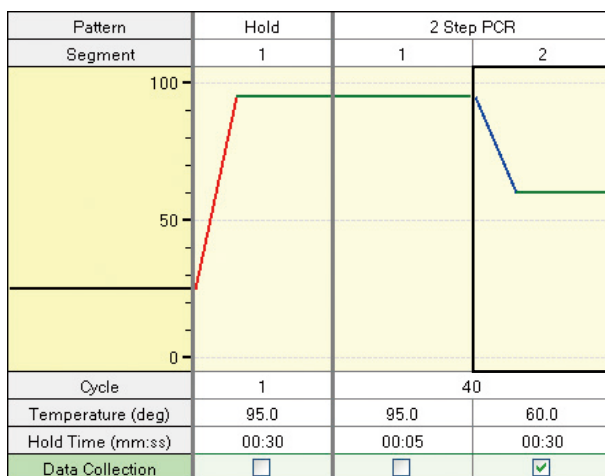
試薬	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix（2×）	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM＊1
TaqMan プローブ	1 μl	＊2
template	2 μl	＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	8.5 μl	
Total	25 μl	

＊ 1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。Thermal Cycler Dice Real Time System III、*II* および *Lite* の場合、通常、最終濃度 0.1 ～ 0.5 μM の範囲で検討する。

＊ 3：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。アニーリング／伸長時間は 20 ～ 30 秒に設定できますが、より安定した結果が得られる 30 秒で、まずお試しください。（16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）

シャトル PCR 標準プロトコール

Hold（初期変性）
Cycle：1
95℃　30 秒

2 Step PCR
Cycle：40
95℃　 5 秒
60℃　30 秒

> ※ 使用上の注意
> 本製品に使用している DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
> PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、Thermal Cycler Dice Real Time System III、*II* および *Lite* の取扱説明書をご参照ください。

【 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System、StepOnePlus Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法 】

※ Life Technologies の各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜1 反応あたり＞

試薬	使用量	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix（2×）	10 μl	25 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM＊1
TaqMan プローブ	0.8 μl	2 μl	＊2
ROX Reference Dye（50×）＊3	0.4 μl	1 μl	1×
template	2 μl	4 μl	＊4
dH_2O（滅菌蒸留水）	6 μl	16 μl	
Total	20 μl＊5	50 μl＊5	

＊ 1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

＊ 3：ROX Reference Dye（50×）は最終濃度 1×で使用する。

＊ 4：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。20 μl あたり DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

＊ 5：各装置の推奨容量に従って調整する。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。(16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。)

＜ 7300 Real-Time PCR System ＞

<u>シャトル PCR 標準プロトコール</u>

Stage 1：初期変性
Reps：1
95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
Reps：40
95℃　5 秒
60℃　31 秒

＜ StepOnePlus Real-Time PCR System ＞

<u>Fast プロトコール</u>

Holding Stage
Reps：1
95℃　20 秒
Cycling Stage
Number of Cycles：40
95℃　1 秒
60℃　20 秒

> ※ 使用上の注意
> 本製品に使用している DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃(5 ～)15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
> PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、各装置の取扱説明書をご参照ください。

【 Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法 】

※ Life Technologies の各装置の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜1 反応あたり＞

試薬	使用量	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix（2×）	10 μl	25 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	1 μl	0.2 μM＊1
TaqMan プローブ	0.8 μl	2 μl	＊2
ROX Reference Dye II（50×）	0.2 μl	0.5 μl	0.5×＊3
template	2 μl	4 μl	＊4
dH_2O（滅菌蒸留水）	6.2 μl	16.5 μl	
Total	20 μl＊5	50 μl＊5	

＊ 1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

＊ 3：ROX Reference Dye II（50×）は最終濃度 0.5×で使用する。

＊ 4：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。20 μl あたり DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10%以下になるようにする。

＊ 5：各装置の推奨容量に従って調整する。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。
まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。
（16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）

＜ 7500 Real-Time PCR System ＞

シャトル PCR 標準プロトコール

Stage 1：初期変性
Reps：1
95℃　30 秒
Stage 2：PCR 反応
Reps：40
95℃　 5 秒
60℃　34 秒

＜ 7500 Fast Real-Time PCR System ＞

Fast プロトコール

Holding Stage
Reps：1
95℃　20 秒
Cycling Stage
Number of Cycles：40
95℃　 3 秒
60℃　30 秒

※ 使用上の注意 本製品に使用している DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。 PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、各装置の取扱説明書をご参照ください。

【 LightCycler 96 System を用いる場合の操作方法 】

※ LightCycler 96 System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix（2×）	10 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM＊1
TaqMan プローブ	0.8 μl	＊2
template	2 μl	＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	6.4 μl	
Total	20 μl	

＊ 1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

＊ 3：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。（16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）

シャトル PCR 標準プロトコール

Hold（初期変性）
　Cycle：1
　95℃　30 秒
2 Step PCR
　Cycle：40
　95℃　 5 秒
　60℃　30 秒

> ※ 使用上の注意
> 本製品に使用している DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
> PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、LightCycler 96 System の取扱説明書をご参照ください。

【LightCycler 480 System を用いる場合の操作方法】

※ LightCycler 480 System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix（2×）	10 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM＊1
TaqMan プローブ	0.8 μl	＊2
template	2 μl	＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	6.4 μl	
Total	20 μl	

＊1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 〜 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊2：プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

＊3：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。（16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）

<u>シャトル PCR 標準プロトコール</u>

Hold（初期変性）
　Cycle：1
　95℃　30 秒
2 Step PCR
　Cycle：40
　95℃　 5 秒
　60℃　30 秒

> ※ 使用上の注意
> 本製品に使用している DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 〜）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
> PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、LightCycler 480 System の取扱説明書をご参照ください。

【CFX96 Real-Time PCR Detection System を用いる場合の操作方法】

※ CFX96 Real-Time PCR Detection System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix（2×）	10 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.4 μl	0.2 μM＊1
TaqMan プローブ	0.8 μl	＊2
template	2 μl	＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	6.4 μl	
Total	20 μl	

＊1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊2：プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。

＊3：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応を開始する。

PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。（16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）

<u>シャトル PCR 標準プロトコール</u>

Hold（初期変性）
  Cycle：1
  95℃ 30 秒
2 Step PCR
  Cycle：40
  95℃ 5 秒
  60℃ 30 秒

> ※ 使用上の注意
> 本製品に使用している DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
> PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、CFX96 Real-Time PCR Detection System の取扱説明書をご参照ください。

【 Smart Cycler II System を用いる場合の操作方法 】

※ Smart Cycler System の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す PCR 反応液を調製する。

＜ 1 反応あたり＞

試薬	使用量	最終濃度
Probe qPCR Mix（2×）	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM＊1
PCR Reverse Primer（10 μM）	0.5 μl	0.2 μM＊1
TaqMan プローブ	1 μl	＊2
template	2 μl	＊3
dH_2O（滅菌蒸留水）	8.5 μl	
Total	25 μl	

＊ 1：最終プライマー濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ～ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

＊ 2：プローブ濃度は、使用するリアルタイム PCR 装置の機種やプローブの蛍光標識物質により異なる。装置の取扱説明書やプローブの添付データシートを参考に添加量を検討する。Smart Cycler System/Smart Cycler II System の場合、通常、最終濃度 0.1 ～ 0.5 μM の範囲で検討する。

＊ 3：template 溶液中に存在するターゲットのコピー数により異なる。段階希釈して適当な添加量を検討する。DNA template 100 ng 以下を用いることが望ましい。また、RT-PCR で cDNA（RT 反応液）を template として添加する場合は、PCR 反応液容量の 10% 以下になるようにする。

2. 反応チューブを Smart Cycler 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler にセットし、反応を開始する。

   PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まず、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。（16 ページの「PCR 反応条件について」をご参照ください。）

   シャトル PCR 標準プロトコール

   Stage 1：初期変性
   Hold
   95℃　30 秒
   Stage 2：PCR 反応
   Repeat：40 times
   95℃　5 秒
   60℃　20 秒

> ※ 使用上の注意
> 本製品に使用している DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5 ～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。
> PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

   解析方法は、Smart Cycler System 取扱説明書をご参照ください。

< PCR 反応条件について >

ステップ	温度	時間	検出	コメント
初期変性	95℃	30 秒	OFF	初期変性は通常 95℃ 30 秒で十分である。環状プラスミドやゲノム DNA など変性しにくい鋳型でもこの条件で良好に反応できることが多い。鋳型の状態によっては、95℃ 1 ～ 2 分程度に延長することが可能だが、時間が長すぎると酵素の失活を招く恐れがあるため、2 分以上の条件は推奨しない。

シャトル PCR（2 ステップ PCR）　　　　サイクル数：30 ～ 45 サイクル

ステップ	温度	時間	検出	コメント
変性	95℃	3 ～ 5 秒	OFF	リアルタイム PCR の増幅サイズは一般的に 300 bp 以下なので、95℃で 3 ～ 5 秒程度でよい。
アニーリング／伸長	56 ～ 64℃	20 ～ 30 秒（31、34 秒）＊	ON	反応条件の至適化を行う場合には、56 ～ 64℃の範囲で検討する。反応性が悪いときは、このステップの時間を延ばすと改善する場合がある。

＊： Life Technologies の装置では、検出ステップを 30 秒以内に設定できない機種があります。
7300 Real-Time PCR System は 31 秒以上、
7500 Real-Time PCR System は 34 秒以上で設定します。

VII.　参考文献

1）吉崎美和、向井博之（2005）実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない！「検出と定量のコツ」　第 3 章 核酸の検出と定量のコツ　4. リアルタイム定量 PCR のコツ　p120-126

2）吉崎美和、向井博之（2008）実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1）リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析　p39-43

VIII.　関連製品

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR037A/B）
PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)（製品コード RR047A/B）
PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)（製品コード RR036A/B）
One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR064A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820S/A/B）
SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420S/A/B）
SYBR Fast qPCR Mix（製品コード RR430A）
One Step SYBR® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time)（製品コード RR096A/B）

Thermal Cycler Dice® Real Time System III（製品コード TP950/TP970/TP980/TP990）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
Smart Cycler II System（製品コード SC200N/SC210N）

IX. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また､食品､化粧品､家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Thermal Cycler Diceはタカラバイオ株式会社の､TaqManはRoche Diagnostics GmbHの､SYBR は Molecular Probes, Inc. の登録商標です。*Premix Ex Taq*、PrimeScript はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201509Da